

**PERTUMBUHAN *Bacillus cereus* DAN *Clostridium perfringens*
PADA MAKANAN TAMBAHAN PEMULIHAN YANG DIKONSUMSI BALITA
PENDERITA GIZI BURUK¹⁾**

***(The Growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in Donated
Powdered Milk Formula which Consumed by Severe Malnutrition Children
Under Five Years)***

**Maya Purwanti, Mirnawati Sudarwanto²⁾,
Winiati P. Rahayu²⁾, dan A. Winny Sanjaya²⁾**

ABSTRACT

*Through a nutritional improvement project, Bogor District had donated powdered milk formula (PMF) for severe malnutrition children under five years. Powdered milk formula was assumed as an unsterilized product, because it might contain spore forming bacteria. To evaluate the bacterial contaminant of home prepared milk formula, forty eight samples of PMF, and 50 samples of reconstitution formula, drinking water, drinking equipment, and hand were taken proporsionally from the mothers in 10 Health Community Centre around Bogor District. Samples were analyzed for aerobic microbe, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and the potential of enterotoxins production. All of the donated PMF samples exhibiting a total aerobic count of $<10^4$ CFU/g (mean 1.2×10^2 CFU/g) and *B. cereus* count of $<10^3$ CFU/g (mean 3.0×10^2 CFU/g for PMF containing this bacterium). Improper home storage promote the growth of aerobic microbe and *B. cereus*. Improper preparation promote the growth of *B. cereus* which present initially at low level (mean 7.8×10 CFU/g) and became 1.6×10^3 CFU/ml after the reconstitution. *Clostridium perfringens* emerge at 4 samples (mean 1.5×10 CFU/ml) after the reconstitution. Several isolate of *B. cereus* (4 from PMF, 13 from opened PMF, and 2 from reconstitution formula) showed a possibility to produce diarrheagenic enterotoxin while the isolate of *C. perfringens* did not shown it.*

Keywords: *powdered milk formula, *B. cereus*, *C. perfringens*, diarrheagenic enterotoxin, preparation and storage*

PENDAHULUAN

Pada tahun 2005 diperkirakan sekitar 1.5 juta balita Indonesia menderita gizi buruk (Depkes, 2005). Untuk memperbaiki kondisi balita tersebut, Pemerintah Kabupaten Bogor pada tahun 2006 memberikan makanan tambahan pemulihan (MT-P) melalui program perbaikan gizi. Pemberian MT-P dilakukan dalam dua bentuk, yaitu makanan suplemen bubuk yang diberikan pada 30 hari pertama dan susu formula bubuk yang diberikan selama 150 hari berikutnya. Jumlah balita yang menjadi obyek diperkirakan mencapai 4.500 anak (Dinas Kesehatan Kabupaten Bogor, 2006).

¹⁾ Bagian dari disertasi penulis pertama, Program Studi Sains Veteriner, Sekolah Pascasarjana IPB

²⁾ Berturut-turut Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing

Susu formula bubuk sebenarnya bukan bahan pangan yang steril (Dadhicd, 2006), perlakuan dalam pengolahannya (pasteurisasi, konsentrasi, dan pengeringan) belum mampu mengeliminasi seluruh mikroba yang ada di dalam susu mentahnya. Bakteri pembentuk spora seperti *Bacillus cereus* dan *Clostridium* spp. yang ditemukan dalam susu mentah masih mampu bertahan selama proses pengolahan karena sporanya tahan terhadap panas (Muir, 2000).

Susu formula bentuk bubuk dan bersifat mudah larut menyebabkan ibu kurang memperhatikan tata cara pelarutan dan penyimpanannya, akibatnya jumlah dan jenis bakteri bertambah. *Bacillus cereus* enterogenik dan *C. perfringens* tipe A terdistribusi luas di lingkungan (Labbe, 1989), balita yang meminum susu formula tercemar akan berisiko terserang gastroenteritis. Sebuah kejadian luar biasa akibat keracunan pangan yang melibatkan 35 neonatus di Chile diduga berhubungan dengan *B. cereus* dalam susu bubuk (Cohen *et al.*, 1984). Level *B. cereus* yang terdeteksi dalam susu berkisar 50-200 spora/g. Keberadaan *B. cereus* enterogenik dalam makanan bayi yang didistribusikan di 17 negara telah dilaporkan oleh Becker *et al.* (1994). Efuntoye dan Adetosoye (2004) melaporkan bahwa 3% kasus diare sporadik pada balita di Nigeria disebabkan oleh *Clostridium* spp., dan 72% oleh *C. perfringens* tipe A.

Bacillus cereus adalah bakteri aerob gram positif yang mampu membentuk spora dan menyebabkan gastroenteritis karena mampu membentuk kompleks enterotoksin. *Clostridium perfringens* adalah bakteri anaerob gram positif yang mampu membentuk spora. Strain yang menjadi penyebab keracunan pangan adalah tipe A dengan enterotoksin yang dapat menyebabkan sakit perut akut dan diare. Gejala penyakit dari kedua bakteri di atas biasanya muncul 8-16 jam setelah mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi, dan sembuh dengan sendirinya dalam 12-24 jam (Jay, 2000; Ray, 2001).

Diare kategori sedang kausa *B. cereus* dan *C. perfringens* oleh masyarakat cenderung dianggap biasa sebab dengan atau tanpa pengobatan diare tersebut dapat sembuh sehingga tidak dilaporkan. Bagi balita penderita gizi buruk, diare tersebut akan berpengaruh nyata pada bobot badan dan status kesehatan umumnya sehingga pencapaian status gizi baik dan sehat menjadi lebih lama. Melihat keadaan tersebut, perlu dilakukan (1) evaluasi terhadap keberadaan dan mutu mikrobiologik *B. cereus* dan *C. perfringens* pada MT-P yang dikonsumsi balita penderita gizi buruk serta melihat kemampuannya dalam membentuk enterotoksin, (2) evaluasi terhadap kesadaran ibu dalam mencegah masuknya kontaminan dalam susu bubuk yang disimpan di rumah dan siap konsumsi bagi balitanya, dan (3) analisis terhadap asosiasi berbagai faktor yang berpengaruh dalam penyajian MT-P siap konsumsi, khususnya terhadap keberadaan *B. cereus* dan *C. perfringens*.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini mengikuti program pemberian MT-P bagi balita gizi buruk yang dilaksanakan Pemerintah Kabupaten Bogor. Penelitian lapangan dan pengambilan sampel dilakukan mulai Juli 2006 sampai Januari 2007. Isolasi dan identifikasi mikrobiologik dilakukan di Laboratorium Bakteriologi FKH IPB dari Juli 2006 sampai Januari 2008.

Penentuan Unit Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel MT-P bubuk yang diambil berdasarkan pada sistem *acceptance quality level* (AQL)-6.5 (SNI 01-23275-1991), yaitu sebanyak 48 unit, diambil secara proporsional dari 10 Puskesmas di Kabupaten Bogor. Sampel diambil dari ibu yang memiliki balita berumur 2-5 tahun yang menderita gizi buruk dan ditetapkan oleh Puskesmas sebagai penerima MT-P.

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua tahap, yaitu pertama, melakukan survei, pengamatan, wawancara, dan pengambilan sampel pada ibu penerima bantuan MT-P; kedua, melakukan uji mutu mikrobiologik sampel.

Pengamatan dan pengambilan sampel

Pengamatan secara langsung dan pengisian kuesioner dilakukan untuk mengetahui kondisi lingkungan tempat tinggal dan ketrampilan responden dalam menyiapkan MT-P. Untuk mengetahui mutu mikrobiologik MT-P dalam kemasan, dikoleksi sebanyak 50-100 g. Untuk mengetahui mutu mikrobiologik MT-P siap konsumsi, dikoleksi dari MT-P yang sudah dilarutkan oleh responden sebanyak 100 ml, swab dari tangan kanan dan kiri responden seluas 20 cm² (Sveum *et al.*, 1992), bilasan dari tempat minum sebanyak 20 ml (Harrigan 1998), serta air minum matang dan mentah masing-masing sebanyak 100 ml (Harrigan, 1998). Untuk melihat mutu mikrobiologik selama penyimpanan di rumah, dikoleksi sampel dari MT-P bubuk yang kemasannya sudah dibuka sebanyak 50-100 g, diambil setiap 2 hari sampai MT-P tersebut habis. Seluruh sampel dibawa dalam kontainer es dan dianalisis segera setelah sampai di laboratorium.

Pengukuran mutu mikrobiologis

Analisis mutu mikrobiologik untuk seluruh sampel mengacu kepada *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* edisi ke-3 (APHA, 1992). Deteksi potensi *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam menghasilkan enterotoksin menggunakan uji aglutinasi dengan perangkat uji komersial *reversed passive latex agglutination* (RPLA) yang dikembangkan oleh Oxoid (1998).

Jumlah mikroba aerob dihitung dari sampel MT-P (bubuk dan terlarut), bilasan dari tempat minum, air minum matang, dan swab dari tangan. Sampel ditimbang/diukur sebanyak 20 gram atau ml dicampur dengan 180 ml *peptone-saline* (0.1% peptone dan 0.85% NaCl), dihomogenkan selama 2 menit (larutan 10⁻¹), selanjutnya diikuti dengan pengenceran seri. Khusus untuk swab, dikocok dalam 10 ml Buffer Peptone Water (BPW 0.1%) selama 30 detik, selanjutnya dibuat pengenceran seri. Kontrol disiapkan dengan memanaskan air minum mentah dari responden sampai suhu 100°C selama 2 menit, didinginkan sampai suhu 70°C, digunakan untuk melarutkan MT-P dengan ukuran sesuai petunjuk di kemasan. Selanjutnya, air minum mentah, air matang kontrol, dan larutan MT-P kontrol diperlakukan seperti sampel lainnya. Hasil pengenceran seri (1 ml) dipupuk pada *Plate Count Agar* (PCA, Difco) dengan metode tuang, diinkubasi pada suhu 35°C selama 20-24 jam. Seluruh koloni yang tumbuh dihitung (20-200) dan direpresentasikan dalam *colony forming unit* (CFU).

Deteksi *B. cereus* dilakukan pada seluruh sampel. Khusus sampel MT-P bubuk, pada pengenceran 10^{-1} dilakukan *heat shock* dalam penangas air (70°C , 15 menit) kemudian dibuat pengenceran seri. Setiap pengenceran seri sampel (0.1 ml) dipupuk di atas lempeng agar *mannitol-egg yolk-polymyxin* (Difco) dengan bantuan *hockey stick*, diinkubasi pada suhu 30°C selama 20-24 jam. Koloni dengan zona presipitasi warna eosin merah jambu-lavender dihitung (15-150 koloni). Minimum 5 koloni diambil sebagai subyek konfirmasi, diuji terhadap motilitas, fermentasi glukosa, reaksi Voges-Proskauer, dan reduksi nitrat menjadi nitrit. Jumlah *B. cereus* dihitung berdasarkan rasio koloni yang menunjukkan uji positif terhadap koloni presumtif yang diuji.

Deteksi *C. perfringens* dilakukan pada seluruh sampel. Khusus MT-P bubuk, 20 gram sampel dilarutkan dalam 180 ml *fluid thyoglicolate medium* (Oxoid). Seluruh homogenat dari sampel diberi *heat shock* dalam penangas air (70°C , 15 menit) kemudian dibuat pengenceran seri. Selanjutnya, 0.1 ml sampel dipupuk pada agar *tryptose-sulfite-cycloserin* (TSC, Oxoid) yang mengandung kuning telur dengan bantuan *hockey stick*, lalu dilapis dengan TSC tanpa kuning telur, diinkubasi anaerob pada suhu 35°C selama 20-24 jam. Koloni hitam dengan zona presipitasi dihitung (20-200 koloni). Minimum 5 koloni diambil sebagai subyek konfirmasi, diuji terhadap motilitas dan reduksi nitrat menjadi nitrit, uji fermentasi laktosa dan uji mencairkan gelatin dalam 48 jam. Jumlah *C. perfringens* dihitung dari rasio koloni yang menunjukkan uji positif terhadap koloni presumtif yang diuji.

Pengujian kemampuan isolat memproduksi enterotoksin dilakukan dengan cara isolat *B. cereus* diinokulasi ke dalam *brain heart infusion* (BHI, Difco) dan diinkubasi pada suhu $32-35^{\circ}\text{C}$ selama 6-18 jam pada inkubator berputar (*orbital shaking incubator*, Firstek) dengan kecepatan 250 putaran/menit. Isolat bakteri *C. perfringens* diinokulasi ke dalam *cooked meat medium* (CMM, Difco) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam, kemudian diinaktivasi dengan dipanaskan pada suhu 75°C selama 20 menit. Inokulasi 0.8 ml kultur CMM (diambil dari dasar tabung) ke dalam 16-18 ml *modified duncan strong medium* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah terlihat keruh, 10 ml sampel disentrifus (Sorvall) pada suhu 4°C selama 20 menit dengan putaran 900 g. Filtrat selanjutnya digunakan untuk uji enterotoksin dengan menggunakan *Bacillus cereus enterotoxin-reverse passive latex agglutination* (BCET-RPLA) kit (Oxoid) dan untuk toksin *C. perfringens* tipe A menggunakan *Perfringens enterotoxin reverse passive latex agglutination* (PET-RPLA) kit (Oxoid).

Analisis Data

Untuk analisis statistika semua jumlah bakteri ditransformasikan ke dalam logaritma, hasilnya dianalisis secara deskriptif. Untuk menentukan keamanan MT-P yang dibagikan dan yang dipreparasi responden, data yang diperoleh dibandingkan dengan standar yang berlaku di Indonesia (SNI 01-7111-2005 MP-ASI bubuk instan dan siap makan) dan Australia-New Zealand (Standar 1.6.1 issue 78, Food Standard Australia-New Zealand tahun 1999). Untuk melihat asosiasi berbagai faktor yang mempengaruhi jumlah bakteri di dalam MT-P yang disimpan di rumah tangga dan yang dipreparasi oleh responden, data yang diperoleh diolah dengan menggunakan SPSS 15.0. Data dari kuesioner digunakan sebagai data pendukung data mikrobiologik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mutu Mikrobiologik MT-P

Makanan tambahan pemulihan yang dibagikan dikemas dalam kantong aluminium dan karton dengan bobot 400 gram. Pada label karton tercantum aturan preparasi dan komposisi penyusunnya. Komposisi MT-P terdiri atas susu skim, lemak susu, vitamin, dan mineral. Bahan-bahan tersebut di pabrik dicampur secara kering (*dry mix*). Proses pencampuran secara kering tidak menggunakan panas sehingga berisiko terkontaminasi mikroba. Pangan dapat dinyatakan aman jika jumlah dan keberadaan mikroba di dalamnya tidak melebihi standar yang berlaku. Keadaan mikroba dalam MT-P dapat dinilai dari jumlah mikroba aerob, sedangkan keberadaan bakteri pembentuk spora dapat dilihat dari jumlah *B. cereus* dan *C. perfringens* (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah bakteri aerob, *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam MT-P yang didistribusikan bagi balita penderita gizi buruk dan kesesuaiannya dengan standar (n=48 sampel)

Jenis Mikroba	Jumlah (CFU/g)			Kesesuaian dengan standar	
	Rata-rata	Minimal	Maksimal	≤ standar	> standar
Mikroba aerob ^a	1.2x10 ²	2.0x10	5.5x10 ³	100%	0%
<i>B. cereus</i> ^b	3.0x10 ²	0	1.0x10 ³	85%	15%
<i>C. perfringens</i> ^b	Tidak ditemukan			100%	0%

^a SNI 01-7111.1-2005 MP-ASI bubuk instan: jumlah mikroba aerob maksimal 1.0x10⁴ CFU/g

^b Standar 1.6.1 issue 78 (FSANZ 1999): jumlah *B. cereus* 10² CFU/g, jika 20% sampel mengandung ≥ 10³ CFU/g, lot harus ditolak; jumlah *C. perfringens* <1 CFU/g, jika 40% sampel mengandung ≥ 10 CFU/g, lot harus ditolak.

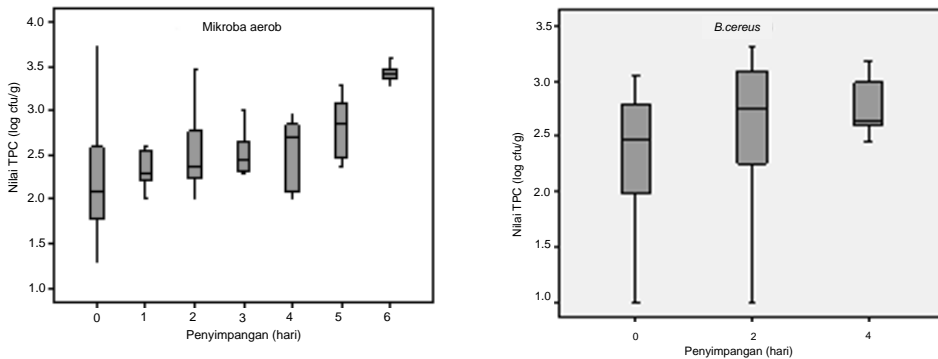
Menurut EFSA (2004), jumlah mikroba aerob pada akhir pembuatan susu bubuk sampai dengan 5.0x10² CFU/g dianggap sebagai keadaan yang wajar. Di pabrik, mikroorganisme mampu membuat akses ke jalur pengolahan dan produk sebab belum ada teknologi yang secara lengkap mengeliminasi mikroorganisme ini dari lingkungan pabrik (Codex Alimentarius Commission, 2007).

Adanya *B. cereus* di dalam MT-P menandakan adanya bakteri aerob pembentuk spora yang bertahan hidup. Keadaan tersebut membuktikan bahwa MT-P yang berbahan dasar susu bukanlah bahan pangan yang steril. Ketidaksterilan tersebut terjadi karena bahan baku penyusunnya mengandung bakteri atau terjadi rekontaminasi selama proses pencampuran (*mixing*) dan pengemasan. *Clostridium perfringens* tidak ditemukan dalam sampel yang diuji, kemungkinan penyebabnya adalah (1) bakteri memang tidak ada di dalam sampel, (2) sampel yang diuji jumlahnya terlalu sedikit sehingga tidak mencerminkan keadaan yang sebenarnya, dan (3) bakteri ini memang agak sulit diisolasi dari bahan kering karena tidak toleran pada aktivitas air (*a_w*) yang rendah (Gibbs, 2003).

Dari analisis dengan standar ternyata 100% sampel memiliki jumlah mikroba aerob di bawah SNI 01-7111.1-2005, dan hanya 15% sampel memiliki jumlah *B. cereus* yang melebihi standar 1.6.1 issue 78 (FSANZ, 1999). Berdasarkan ketentuan yang berlaku, seluruh MT-P dinyatakan aman untuk didistribusi dan dikonsumsi. Kewaspadaan tetap harus ditingkatkan karena 4 kemasan (8%) memiliki isolat *B. cereus* yang mampu membentuk enterotoksin.

Mutu Mikrobiologik MT-P yang Disimpan di Rumah

Pembagian MT-P dalam bentuk bubuk dimaksudkan untuk memudahkan dalam pendistribusian dan penyimpanan. Sekali kemasan dibuka, kewaspadaan terhadap keamanan produk tetap harus ditegakkan karena MT-P bubuk bukanlah produk yang steril sehingga keteledoran dalam penyimpanan akan menambah jumlah dan jenis bakteri yang tumbuh di dalamnya. Keadaan ini tercermin dalam Gambar 1.



Gambar 1. Sebaran nilai TPC (hari ke-0 sampai ke-6) dan *B. cereus* (hari ke-0, 2 dan 4) pada MT-P yang disimpan di rumah (n=91 sampel)

Dari Gambar 1 terlihat bahwa dari hari ke hari jumlah bakteri baik dalam rata-rata jumlah mikroba aerob maupun rata-rata jumlah *B. cereus* bertambah jumlahnya. Berdasarkan analisis *one-way anova* pada jumlah mikroba aerob, lama penyimpanan berpengaruh pada total jumlah mikroba di dalam MT-P yang kemasannya sudah dibuka ($F=1.70$, $p<0.05$), dengan nilai korelasi Pearson $r=0.36$. Dengan uji *Wilcoxon Signed Rank Test* pertambahan jumlah bakteri secara signifikan berubah setelah hari ke-2 ($P<0.01$). Hal ini terjadi karena (1) rekontaminasi dari tangan responden sewaktu mengambil susu ($r=0.45$, $P<0.01$) dan (2) cara responden menyimpan produk yang sudah dibuka ($r=-0.50$, $P<0.05$).

Pengamatan yang dilakukan di rumah responden memperlihatkan bahwa 24% sampel disimpan tetap dalam kemasan dan dibiarkan terbuka, 38% sampel disimpan dalam kemasan tetapi tidak tertutup secara rapat, dan hanya 38% sampel disimpan cukup rapat karena kemasan dilipat dan diikat dengan karet, atau dipindahkan ke stoples yang berpenutup atau disimpan dalam kaleng susu.

Kurang rapatnya penyimpanan susu bubuk akan menyebabkan bubuk susu menarik air dari udara luar sehingga produk menjadi lebih lembab. Peningkatan kelembaban suatu produk yang kering memberi kesempatan kepada bakteri terluka (*injured*) untuk menyembuhkan diri dan berbiak, serta bakteri pembentuk spora berubah menjadi sel vegetatif dan berbiak.

Jumlah mikroba aerob dalam MT-P yang sudah dibuka adalah 100% di bawah standar (10^4 CFU/g), dan jumlah *B. cereus* masih di dalam rentang standar (10^3 CFU/g). Kondisi MT-P bubuk yang telah dibuka masih dalam rentang batas aman untuk dikonsumsi. Kewaspadaan tetap harus ditingkatkan karena dari 30 isolat *B. cereus* yang diuji, 43% isolat mempunyai potensi memproduksi enterotoksin.

Mutu Mikrobiologik MT-P Siap Minum

Melarutkan MT-P bubuk menjadi bentuk cair seharusnya mampu mengeliminasi sebagian besar bakteri di dalamnya karena responden penerima bantuan telah mendapatkan penyuluhan cara melarutkan MT-P dari petugas kesehatan di puskesmas (petugas gizi atau bidan), kader posyandu, atau mempelajarinya sendiri dari kemasan MT-P. Namun, yang terjadi di lapangan berbeda dari yang diharapkan (Tabel 2). Jumlah bakteri setelah dilarutkan cenderung naik ($p < 0.05$), bahkan bertambah dengan munculnya *C. perfringens* di dalam MT-P siap minum.

Tabel 2. Nilai rata-rata jumlah mikroba aerob, *B. Cereus*, dan *C. Perfringens* dalam MT-P bubuk, siap minum, dan kontrol serta kemampuannya membentuk enterotoksin (n=50 sampel)

Jenis mikroba	Bentuk MT-P		Kontrol MT-P siap minum
	Bubuk	Siap minum	
Mikroba aerob	6.7×10^2 CFU/g	8.2×10^4 CFU/ml	4.4×10 CFU/ml
<i>B. cereus</i>	7.8×10 CFU/g ^a	1.6×10^3 CFU/ml ^a	3.5×10 CFU/ml ^b
<i>B. cereus</i> enterotoksin	2 isolat	2 isolat	Tidak ditemukan
<i>C. perfringens</i>	Tidak ditemukan	1.5×10 CFU/ml ^c	Tidak ditemukan
<i>C. perfringens</i> enterotoksin		negatif	

^a dalam 6 sampel; ^b dalam 3 sampel; ^c dalam 4 sampel

Untuk melihat keamanan MT-P siap minum (Tabel 3), ternyata 96% sampel memiliki jumlah mikroba aerob di atas standar (10^2 CFU/g). Dari 6 sampel yang mengandung *B. cereus*, 83% sampel memiliki jumlah *B. cereus* yang melebihi standar (10^2 CFU/g), dan dari 4 sampel yang mengandung *C. perfringens*, 100% memiliki jumlah *C. perfringens* yang melebihi standar (< 1 CFU/g). Kewaspadaan tetap harus ditingkatkan karena 4% sampel MT-P bubuk dan siap minum memiliki isolat *B. cereus* yang mampu membentuk enterotoksin. Tidak ada isolat *C. perfringens* yang diuji berpotensi menghasilkan enterotoksin. Hasil negatif pada uji enterotoksin *C. perfringens* kemungkinan karena strain menghasilkan jumlah toksin yang sangat rendah (1 ng/ml) sehingga tidak terdeteksi (Granum et al., 1984). Konsentrasi minimal enterotoksin dari *C. perfringens* yang mampu menyebabkan diare adalah 7 ng/g faeses (Brett et al., 1992).

Tabel 3. Kesesuaian hasil pemeriksaan MT-P siap minum dengan SNI 01-711-2005 dan Standar 1.6.1 issue 78 (ANZ 1999)

Jenis mikroba	Bentuk MT-P	Hasil yang diperoleh		
		n	≤ standar	> standar
Mikroba aerob ^a	- Bubuk	50	100%	0%
	- Siap minum	50	4%	96%
<i>B. cereus</i> ^b	- Bubuk	6	67%	33%
	- Siap minum	6	17%	83%
<i>C. perfringens</i> ^b	- Bubuk	50	100%	0%
	- Siap minum	4	0%	100%

^a SNI 01-711-2005 MP-ASI bubuk instan: nilai TPC maksimal 1.0×10^4 CFU/g, siap santap 1.0×10^2 CFU/g

^b Standar 1.6.1 issue 78 (FSANZ 1999): nilai *B. cereus* 10^2 CFU/g; nilai *C. perfringens* < 1 CFU/g

Andresen *et al.* (2007) menemukan bahwa 67% susu formula yang disiapkan di klinik dan 81% susu formula yang disiapkan oleh ibu penderita HIV di Afrika Selatan terkontaminasi oleh bakteri fekal. Sampel dari klinik ternyata mengandung *Escherichia coli* (62%) dan *Enterococcus* sp. (24%) melebihi rekomendasi pemerintah Amerika Serikat, yaitu 10 CFU/ml.

Bertambahnya jumlah bakteri dalam MT-P siap minum, selain akibat mikroba yang sudah terdapat di dalam MT-P, juga karena suhu preparasi di bawah 70°C, dan adanya mikroba dalam air matang, tempat minum, dan tangan ibu. Menurut Codex Alimentarius Commission (2007), ada empat jalan masuk mikroba ke dalam MT-P, yaitu (1) melalui bahan baku yang dicampurkan pada proses pencampuran kering di pabrik, (2) melalui lingkungan pengolahan yang mengkontaminasi seiring pengeringan, (3) setelah kemasan dibuka, serta (4) selama dan sesudah rekonstitusi oleh pengasuh atau ibu.

Penyiapan MT-P oleh responden ternyata dilakukan pada suhu rata-rata 50.5°C, dengan sebagian besar (98%) melarutkan pada suhu 33-69°C. Hanya 2% responden yang melarutkan pada suhu yang tepat (70°C). Pengaruh suhu pelarutan terhadap jumlah mikrobiologi MT-P siap minum tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh suhu pelarutan MT-P pada pertumbuhan mikroba aerob, *B. Cereus*, dan *C. perfringens* (n=50)

Suhu pelarutan (°C)	Mikroba aerob		<i>B. cereus</i>		<i>C. perfringens</i>	
	n	CFU/ml	n	CFU/ml	n	CFU/ml
33-50	30	1.7x10 ⁵	4	1.4x10 ³	3	1.7x10
51-69	19	3.5x10 ⁴	2	2.0x10 ³	1	1.0x10
70*	1	1.3x10 ⁴	-	-	-	-

*suhu 70°C adalah suhu pelarutan susu formula minimal yang direkomendasikan oleh FAO/WHO (2006).

Suhu preparasi MT-P berpengaruh negatif ($r=-0.25$) terhadap pertumbuhan bakteri di dalam MT-P siap konsumsi, tetapi karena 60% responden senang melarutkan MT-P pada suhu antara 33-55°C, perebusan yang benar pada air minum yang digunakan menjadi kunci yang penting. Selain itu, karena langkanya bahan bakar, responden cenderung hanya sekali dalam sehari menyiapkan air panas yang disimpan dalam termos. Kondisi dan kapasitas termos, serta sering atau tidaknya termos dibuka menentukan kestabilan suhu air dalam termos.

Tabel 5. Nilai rata-rata jumlah mikroba aerob, *B. cereus* dan *C. perfringens* dalam air minum, tempat minum dan tangan responden (n=50)

Sampel	Mikroba aerob		<i>B. cereus</i>		<i>C. perfringens</i>	
	n	CFU/ml	n	CFU/ml	n	CFU/ml
Air minum:						
Mentah	50	1.4x10 ⁵	11	3.5x10	3	1.8x10
Matang (responden)	50	1.7x10 ²	4	1.6x10 ³	2	5.1x10
Matang (kontrol)	50	0.5x10	2	1.2x10 ⁴	4	1.5x10
Tempat minum:						
Botol susu	14	1.0x10 ⁵	1	2.5x10 ³	1	5.0x10
Gelas kaca	19	3.7x10 ⁴	4	3.2x10 ³	1	2.0x10
Gelas plastik balita	17	7.3x10 ⁴	3	6.3x10 ²	-	Tidak ditemukan
Tangan ibu:						
Tangan kanan	50	7.8x10 ³	10	5.4x10 ²	3	1.0x10
Tangan kiri	50	8.6x10 ³	8	1.1x10 ³	6	1.4x10

Mendidihkan air minum ternyata tidak selalu dapat membunuh seluruh bakteri yang ada, bahkan jika air mentah tercemari oleh *B. cereus* dan *C. perfringens* (Tabel 5). Suhu perebusan dapat membunuh sel vegetatif, tetapi tidak bagi spora. Lee *et al.* (2006) mengukus kue beras pada suhu 100°C selama 30 menit, ternyata mampu membunuh bakteri patogen nonspora (>6 log CFU/g), tetapi menginaktivasi spora *B. cereus* 1-2 log CFU/g.

Tempat minum yang terlihat bersih ternyata tidak bersih benar, ini terlihat dari hasil pemeriksaan sampel bilasan tempat minum. *Bacillus cereus* dan *B. subtilis* diketahui mampu membentuk *biofilm* pada permukaan benda (Lindsay *et al.*, 2006). Tabel 5 memperlihatkan bahwa botol susu cenderung lebih tinggi jumlah bakterinya jika dibandingkan dengan gelas dan gelas balita. Botol susu sebaiknya tidak hanya dicuci, tetapi juga harus disikat dan jika memungkinkan direbus dalam air mendidih.

Tangan responden ternyata dapat berperan sebagai sumber kontaminan, dengan ditemukannya *B. cereus* dan *C. perfringens* dari hasil swab yang dilakukan (Tabel 5). Menurut Forsythe dan Hayes (1998), di bawah kuku dapat ditemukan bakteri patogen sampai 10⁷ CFU. Dengan demikian, mencuci tangan dengan sabun sebelum menyiapkan makanan merupakan suatu keharusan.

Keseluruhan isolat *B. cereus* dan *C. perfringens* yang diuji dengan RPLA, 11 isolat adalah *B. cereus* enterotoksigenik (1 isolat dari air matang, 4 isolat dari tempat minum, dan 6 isolat dari tangan responden) dan tidak ditemukan isolat *C. perfringens* yang berpotensi menghasilkan enterotoksin.

Analisis korelasi *Pearson product moment* pada jumlah mikroba aerob (Tabel 6) menyatakan adanya mikroba dalam MT-P siap konsumsi dipengaruhi oleh jumlah mikroba dalam MT-P bubuk ($p < 0.05$), kebersihan tempat minum ($p < 0.05$), kebersihan tangan kanan ($p < 0.05$), dan suhu awal preparasi ($p < 0.05$). Rendahnya tingkat pendidikan (90% Sekolah Dasar) dan pendapatan (rata-rata Rp 366 000,-/bulan) serta langkanya bahan bakar (80% menggunakan kayu bakar), membuat para responden tidak dapat mematuhi ketentuan yang disarankan baik oleh petugas kesehatan maupun yang tertulis pada karton kemasan.

Tabel 6. Korelasi jumlah bakteri dalam MT-P siap konsumsi dengan MT-P bubuk, air minum matang, tempat minum, tangan kanan, tangan kiri, dan suhu awal preparasi (n=50)

Variabel independent	r	Signifikansi (2 sisi)
TPC MT-P bubuk (log/g)	0.32*	0.02
TPC air minum matang (log/ml)	0.07	0.63
TPC tempat minum (log/ml)	0.30*	0.04
TPC tangan kanan (log/cm ²)	0.24	0.10
TPC tangan kiri (log/cm ²)	0.13	0.39
Suhu awal preparasi (°C)	-0.25	0.08

a Variabel dependent: jumlah bakteri dalam MT-P siap konsumsi (log/ml).

*. Korelasi signifikan pada level 0,05

Dari analisis regresi berganda yang dilakukan dari data jumlah mikroba aerob, jumlah total mikroba dalam MT-P siap minum (Y) dapat diprediksi melalui rumus regresi berikut ini:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i \text{ (Steel dan Torrie, 1995)}$$

Terdapat enam alternatif model yang dihasilkan dari analisis tersebut (Tabel 7). Dari keenam model tersebut, terlihat jika responden tidak mampu mengendalikan faktor-faktor yang ada di dalam dirinya, muncul multikolinearitas di antara faktor-faktor tersebut (nilai indeks kolinearitas >15), seperti terlihat pada Model 1, 2, dan 3. Jumlah total mikroba dalam MT-P awal tidak dapat dikendalikan oleh responden, yang berperan dalam pengendaliannya adalah pabrik yang memproduksinya. Responden berkewajiban mengendalikannya selama disimpan di rumah.

Tabel 7. Alternatif model regresi untuk jumlah total bakteri dalam MT-P siap minum

	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
Adjusted R ²	16%	18%	18%	11%	12%	9%
β (konstan) (log)	3.56	3.60	4.10	2.05	2.46	3.20
β susu bubuk (log)	0.48	0.49	0.46	0.52	0.50	0.61
β air minum (log)	0.25	0.26	0.26	0.16	-	-
β tempat minum (log)	0.25	0.26	-	0.21	0.22	-
β tangan kanan (log)	0.02	-	-	-	-	-
β suhu awal	-0.04	-0.04	-0.03	-	-	-
Kondisi indeks	20.84	18.74	16.14	14.36	10.70	8.51
Kolinearitas						

Keterangan: Model 1, tanpa ada pengendalian; Model 2, jika responden mampu mengendalikan kebersihan tangan; Model 3, jika responden mampu mengendalikan kebersihan tangan dan tempat minum; Model 4, jika responden mampu mengendalikan kebersihan tangan, tempat minum, dan suhu awal preparasi; Model 5, jika responden mampu mengendalikan kebersihan tangan, suhu awal preparasi, dan air minum; Model 6, jika responden mampu mengendalikan kebersihan tangan, tempat minum, suhu awal preparasi, dan air minum

Untuk meminimalkan risiko hendaknya sesegera mungkin mengkonsumsi susu formula yang telah dilarutkan dan memperpendek waktu konsumsi (*feeding time*) menjadi hanya dua jam (Codex Alimentarius Commission, 2007).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa MT-P yang dibagikan bagi balita penderita gizi buruk cukup aman untuk didistribusikan dan dikonsumsi. Namun, setelah sampai ke tangan responden, kondisinya berubah tidak seperti yang diharapkan.

Saran

Usaha pencegahan harus dilakukan berdimensi multi faset, yaitu yang langsung dikerjakan oleh produsen, petugas kesehatan yang bertugas membimbing para ibu, dan ibu sebagai pengendali langsung risiko yang akan diterima anak jika mengkonsumsi MT-P. Dengan demikian, label produk, program pendidikan konsumen, dan pelatihan bagi para petugas kesehatan tetap selalu harus diperbaharui untuk mencegah ketidaktepatan penyiapan dan penyimpanan MT-P. Tata cara penyiapan dan penyimpanan MT-P yang benar akan mendukung pencapaian tujuan pemberian bantuan, yaitu meningkatkan bobot badan dan kesehatan balita penderita gizi buruk.

DAFTAR PUSTAKA

- Andresen, E., Rollins, N.C., Sturm, A.W., Conana, N., dan Greiner, T. 2007. Bacterial contamination and over dilution of commercial infant formula prepared by HIV-infected mothers in a Prevention of Mothers-to-Child Transmission (PMTCT) Programme, South Africa (Abstract). *J. Trop. Pediatrics* 10: 1093
- [APHA] American Public Health Association. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Edisi ke-3. Washington: American Public Health Association.
- Becker, H., Schaller, G., von Wise, W., and Terplan, G. 1994. *Bacillus cereus* in infant food and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* 23:1-15.
- Brett, M.M., Rodhouse, J.C., Donovan, T.J., Tebbutt, G.M., dan Hutchinson, D.N. 1992. Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 45:609-611.
- Cohen, J., Marambio, E., Lynch, B., and Moreno, A.M. 1984. Infección por *Bacillus cereus* en recién nacidos (Abstract). *Revista Chilena de Pediatría*. 55:20-25.
- Codex Alimentarius Commission. 2007. *Proposed Draft Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children at Step 3*. CX/FH 07/39/4.
- Dadhicd, J.P. 2006. How safe are infant formulas? *J. Neonatology* 20:60-63.
- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2005. *Perkembangan Penanggulangan Gizi Buruk di Indonesia Tahun 2005*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dinas Kesehatan Kabupaten Bogor. 2006. Petunjuk Teknis Program Perbaikan Gizi di Kabupaten Bogor Tahun 2006. Bogor: Seksi Gizi Bidang Binkesmas, Dinas Kesehatan Kabupaten Bogor.
- Efuntoye, M.O. and Adetosoye, A.I. 2004. Sporadic diarrhoea due to *Clostridium perfringens* in children aged five year or below. *African J. of Biotechnology* 3:366-369.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2004. Microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. *The EFSA Journal* 113:1-35.
- FAO/WHO. 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. *Microbiological Risk Management Assessment Series* 6.
- Forsythe, S.J. and Hayes, P.R. 1998. *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. Edisi ke-3. Maryland: Aspen Publishers, Inc.,
- [FSANZ] Food Standards Australia New Zealand. 1999. *Standard 1.6.1 issue 78*. Food Standards Australia New Zealand.

- Gibbs, P. 2003. Characteristic of Spore-forming Bacteria. Dalam C. de W. Blackburn dan P. J. McClure (ed.), *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Granum, P.E., Telle, W., Olsvik, Ø., and Stavn, A. 1984. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetatif growth. *Int. J. Food Microbiol.* 1:43-49.
- Harrigan, W.F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Edisi ke-3. San Diego: Academic Press.
- Jay, J.M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Edisi ke-6. Gainthersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Labbe, R.G. 1989. *Clostridium perfringens*. In M.P. Doyle (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Lee, S.Y., Chung, H.J., Shin, J.H., Dougherty, R.V., and Kangi, D.H. 2006. Survival and growth of foodborne pathogens during cooking and storage of oriental-style rice cakes. *J. Food Prot.* 69:3037-3042.
- Lindsay, D., Brözel, V.S., and von Holy, A. 2006. Biofilm-spore response in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* during nutrition limitation. *J. Food Prot.* 69:1168-1172.
- Muir, D. 2000. Microbiology of Dried Milk Products. In R.K. Robinson, C.A. Batt, dan P.D. Patel (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 2. San Diego: Academic Press.
- Oxoid, 1998. *The Oxoid Manual*. Edisi ke-8. E.Y. Bridson (ed.). Hampshire: Oxoid Limited.
- Ray, B. 2001. *Fundamental Food Microbiology*. Edisi ke-2. Boca Raton: CRC Press.
- Sveum, W.H., Moberg, L.J., Rude, R.A., and Frank, J.F. 1992. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In C. Vanderzant dan D.F. Splittstoesser (editor), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Edisi ke-3. Washington: American Public Health Association.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia 01-23275-1991. *Petunjuk Pengambilan Contoh Pengujian*. Jakarta: Dewan Standarisasi Nasional.
- SNI 01-7111-2005. *Makanan Pendamping Air Susu Ibu (MP-ASI)*. Bagian 1-4. Jakarta: Dewan Standarisasi Nasional.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistik, suatu pendekatan biometrik*. B. Sumantri (Penterjemah). Jakarta: P.T. Gramedia Pustaka Utama.